昆虫学报 *Acta Entomologica Sinica*，February 2008，51(2)：120－125　　ISSN 0454-6296

棉铃虫细胞色素P450 *CYP*9*A*12基因5′-上游区的克隆及序列分析

周颖君，杨亦桦，武淑文，吴益东*

（南京农业大学植物保护学院昆虫学系，农业部病虫监测与治理重点开放实验室，南京　210095）

摘要：细胞色素P450基因*CYP*9*A*12的过量表达已被证实与棉铃虫*Heliocverpa armigera*对拟除虫菊酯的抗性相关。为探明棉铃虫*CYP*9*A*12基因的表达调控机理，根据棉铃虫*CYP*9*A*12基因cDNA全长的5′-末端核苷酸序列，采用基因组步移方法，获得*CYP*9*A*12的5′-上游区序列（总长为3 575 bp）。与cDNA序列进行比对，表明在起始密码子上游3 bp处有一长为2 124 bp的内含子。利用NNPP分析软件预测出转录起始位点，与根据*CYP*9*A*12全长cDNA序列推测的结果是一致的。TFSEARCH 1.3软件分析转录因子结合位点的结果显示，该序列不仅包含启动子的核心结构序列——TATA-box和CAAT-box，亦包含多个转录因子结合位点，如GATA-1，CdxA，Dfd等。本研究结果为深入研究棉铃虫*CYP*9*A*12的表达调控机制及其参与杀虫剂抗性的分子机理奠定了一定基础。

关键词：棉铃虫；细胞色素P450；CYP9A12；基因组步移；5′-上游区

中图分类号：Q965　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：0454-6296(2008)02-0120-06

Cloning and sequence analysis of the 5′-upstream region of cytochrome P450 gene *CYP*9*A*12 of *Helicoverpa armigera* (Hübner)

ZHOU Ying-Jun, YANG Yi-Hua, WU Shu-Wen, WU Yi-Dong* (Key Laboratory of Monitoring and Management of Plant Diseases and Pest Insects, Ministry of Agriculture, Department of Entomology, College of Plant Protection, Nanjing Agricultural University, Nanjing　210095, China)

Abstract: Overexpression of cytochrome P450 *CYP*9*A*12 gene has been proved to be associated with pyrethroid resistance in the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera*. Based on the 5′-end nucleotide sequence of the full length cDNA of *CYP*9*A*12, the 5′-upstream region of *CYP*9*A*12 was obtained by genome walking technique to investigate the regulatory mechanism of *CYP*9*A*12 gene expression. The 5′-upstream fragment of 3 575 bp was successfully cloned and sequenced, and there is an intron (2 124 bp) located 3 bp upstream of the start codon. The transcription initiation site of *CYP*9*A*12 predicted by the NNPP software is consistent with that deduced from the full length cDNA of *CYP*9*A*12. TFSEARCH 1.3 software predicted several *cis*-acting element binding sites in the 5′-upstream region of *CYP*9*A*12, including not only the core promoter sequences (TATA-box and CAAT-box), but also several transcriptional elements (GATA-1, CdxA, Dfd, *etc*.). The current study will provide an important basis for further investigating regulation of *CYP*9*A*12 expression and molecular mechanism of *CYP*9*A*12 involved in insecticide resistance of *H*. *armigera* in future.

Key words: *Helicoverpa armigera*; cytochrome P450; *CYP*9*A*12; genome walking; 5′-upstream region

细胞色素P450单加氧酶系是昆虫体内重要的解毒酶，P450单加氧酶解毒活性增强是昆虫对杀虫剂产生抗性的重要机理（Scott，1999）。对杀虫剂具有降解能力的一个或多个P450基因的过量表达使P450单加氧解毒酶量增加，从而导致昆虫对杀虫剂产生抗性。已在多种昆虫中证实P450基因的组成型过量导致昆虫产生抗药性，如*CYP*6*A*1与家蝇对Diazinon的抗性，*CYP*6*D*1与家蝇对拟除虫菊酯的

基金项目：国家自然科学基金项目(30471154)；高校博士点专项基金(20040407022)

作者简介：周颖君，女，1982年7月生，江苏南通人，硕士研究生，研究方向为昆虫分子毒理学，E-mail：zhouzhou8273@yahoo.com.cn

* 通讯作者 Author for correspondence，E-mail：wyd@njau.edu.cn

收稿日期 Received：2007-06-01；接受日期 Accepted：2007-12-24

抗性，*Cyp6g1* 与果蝇对 DDT 等多种药剂的抗性(Feyereisen，2005)。

棉铃虫 *Helicoverpa armigera* (Hübner) 寄主范围广泛，能为害棉花、玉米、小麦、大豆、花生、蔬菜等多种农作物，是一种世界性的重要经济害虫。20 世纪 80 年代初期，高效、低毒的拟除虫菊酯类杀虫剂被广泛用于防治棉铃虫；1989 年以前棉铃虫对拟除虫菊酯一直比较敏感，但此后中国各棉区的棉铃虫对拟除虫菊酯都产生了不同程度的抗性，并成为上世纪 90 年代初我国华北棉区棉铃虫特大发生的关键因子之一(沈晋良和吴益东，1995)。大量生物测定和生化研究结果表明，棉铃虫对拟除虫菊酯产生抗性的主要机理为细胞色素 P450 介导的氧化解毒作用增强(吴益东等，1995；Yang *et al*.，2004；Chen *et al*.，2005；Yang *et al*.，2005)。棉铃虫对氰戊菊酯的抗性品系(YGF)与同步饲养、未用药剂处理的对照品系(YG)相比，*CYP9A12* mRNA 表达量在 6 龄幼虫脂肪体中增加了 384 倍，在中肠中则增加了 19 倍，从而在分子水平上初步证实了棉铃虫 YGF 品系对拟除虫菊酯的高水平抗性与 *CYP9A12* 等基因的过量表达有关 (杨亦桦，2005；Yang *et al*.，2006)。

昆虫 P450 基因过量表达是由于基因转录增强或 mRNA 更稳定或二者共同作用的结果(Feyereisen，1999)。果蝇 *Cyp6g1* 的过量表达是由于在抗性品系 *Cyp6g1* 转录起始位点上游 291 bp 处插入了一个 *Accord* 逆转录转座子的长末端重复片段(LTR)(Chung *et al*.，2007)。因此，分离、鉴定参与细胞色素 P450 调控的顺式作用元件和反式作用因子已成为目前在 P450 研究领域的热点之一。

基因组步移法(genome walking)是一种利用从基因组中获得已知序列(cDNA 或基因组 DNA)的侧翼序列的方法，常用于获取已知 cDNA 序列的基因的启动子或其他上、下游调控序列的克隆(Sibert *et al*.，1995)。本研究根据 *CYP9A12* 基因 cDNA 编码区 5′-末端核苷酸序列设计特异性引物，运用基因组步移的方法，成功获得其上游启动子区，为下一步深入研究棉铃虫细胞色素 P450 基因过量表达的调控机制奠定了一定基础。

1　材料与方法

1.1　供试昆虫

棉铃虫 SCD 敏感品系为德国拜耳公司提供，该品系于 20 世纪 70 年代采自非洲西部的科特迪瓦(Cote D 'Ivoire)，在不接触任何药剂下用人工饲料饲养，对各种化学农药均敏感。棉铃虫幼虫采用人工饲料饲养，温度 27℃ ± 1℃，光周期 16L∶8D，成虫饲以 10% 蔗糖水。

1.2　棉铃虫基因组 DNA 提取、纯化与质量鉴定

取单头棉铃虫 5 龄幼虫(约 200 mg)，加入含 500 μL 5% SDS 的裂解缓冲液，充分研磨后用苯酚、氯仿反复抽提，14 000 × g 离心 10 min，再加入 500 μL 苯酚，14 000 × g 离心 10 min，移取上清液至一新 Eppendorf 管中，加入 50 μL 7.5 mol/L 醋酸铵和 800 μL 冰乙醇，置于冰上 15 min。挑取悬浮状 DNA 到一新 Eppendorf 管中，加入 500 μL 70% 冰乙醇洗涤，干燥以去除乙醇，加入 60 ~ 100 μL ddH_2O 悬浮 DNA。取 2 μL 棉铃虫基因组 DNA，进行琼脂糖凝胶电泳鉴定其完整性。利用紫外分光光度计测定其浓度，并将终浓度调整至 0.1 g/L，- 20℃保存备用。取 5 μL 棉铃虫基因组 DNA，加入 1.6 μL *Dra* Ⅰ (1×10^{-5} U/L)，2 μL 10 × *Dra* Ⅰ buffer 和 11.4 μL ddH_2O，轻轻混匀，37℃孵育 16 ~ 18 h 后，以未酶切的棉铃虫基因组 DNA 及 Marker 为参照，进行琼脂糖凝胶电泳，鉴定其纯度。

1.3　棉铃虫基因组步移

所有操作按照 Universal Genome Walker™ Kit(美国 Clontech 公司)说明书进行。具体过程简述如下。

1.3.1　DNA 文库的构建：用 *Dra* Ⅰ、*Eco*R Ⅴ、*Pvu* Ⅱ 和 *Stu* Ⅰ 4 种限制性内切酶分别对棉铃虫 SCD 品系幼虫基因 DNA 进行消化后，用 DNA 产物纯化试剂盒回收酶切产物。然后，在 4 μL 已纯化的酶切消化产物中，分别加入 1.9 μL Genome Walker 接头(25 μmol/L)、1.6 μL 5 × T4 连接酶缓冲液和 0.5 μL T4 DNA 连接酶(1×10^{-6} U/L)，轻轻混匀后置于 16℃孵育 16 ~ 18 h，70℃ 5 min 以终止反应，并加入 72 μL TE(pH 7.5)缓冲液，轻轻混匀。至此构建了 4 种连有接头的棉铃虫基因组步移 DNA 文库，置于 - 20℃保存备用。

1.3.2　第一次基因组步移：根据 *CYP9A12* 基因 cDNA 序列(GenBank 登录号为 AY371318)的 5′-核苷酸序列设计两个反向特异引物(W19A12-GSP1 和 W19A12-GSP2)用于基因组步移(引物位置详见图 1)，分别以 4 种 DNA 文库为模板，用 AP1/W19A12-GSP1 这对引物首先进行第 1 轮 PCR 反应后，然后用 AP2/W19A12-GSP2 进行第 2 轮 PCR 扩增；对获得的最长的目标片段进行克隆和测序。引物序列详见表 1，其中引物 AP-1、AP-2 均由试剂盒提供。

1.3.3　第二次基因组步移：根据第一次基因组步移获得的 DNA 片段的序列设计特异性反向引物（W29A12-GSP1、W29A12-GSP2），进行第二次基因组步移，步骤同上，对获得的最长的目标片段进行克隆和测序。

1.4　PCR 产物回收克隆测序

获得的 PCR 产物用凝胶回收试剂盒（安徽优晶公司）进行纯化回收，将纯化的目标片段克隆至 PGEM-Teasy 载体（Promega 公司）。连接反应、转化反应、质粒 DNA 的提取、纯化、酶切等操作步骤均参照相应的试剂盒说明书。DNA 测序由上海英骏公司完成。

1.5　序列分析

用 NNPP 在线分析软件（http://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html）预测 *CYP9A*12 基因 5′-上游区的转录起始位点。用 TFSEARCH 1.3 软件（http://www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html）预测 *CYP9A*12 基因上游非编码区域内各转录因子结合位点。

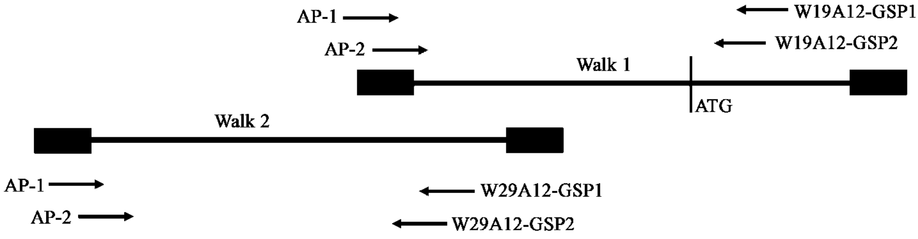

图 1　本研究所设计的引物位置示意图

Fig. 1　Schematic diagram of positions of primers used in the study

Walk 1 为第一次步移，Walk 2 为第二次步移，黑方格为接头。Walk 1 is the first walking reaction, Walk 2 is the second walking reaction, black box means the adapter.

表 1　用于扩增棉铃虫 *CYP9A*12 基因 5′-上游区的引物

Table 1　Primers used in the study for amplification of 5′-upstream region of *CYP9A*12

引物名称 Primer name	引物序列 Primer base (5′ > 3′)
AP-1	GTAATACGACTCACTATAGGGC
AP-2	ACTATAGGGCACGCGTGGT
W19A12-GSP1	ACGCCATACCGAGAGAACCTCGAGTAG
W19A12-GSP2	CGCCACCCAGACCAGGACTAGTATCAT
W29A12-GSP1	TGCCTGACGCTAACCCCCCTTAGGAAT
W29A12-GSP2	TGGCCCAAAGTGCTGGTGGAATGCACT

2　结果与分析

2.1　棉铃虫基因组 DNA 分离与鉴定

将分离纯化的棉铃虫基因组 DNA 进行琼脂糖凝胶电泳，显示出一条边缘整齐清晰的 DNA 条带（图 2∶1），表明所提取的棉铃虫基因组 DNA 非常完整。另外，经 *Dra* Ⅰ 酶切消化的棉铃虫基因组 DNA（图 2∶2）呈均匀涂布状，表明所提取的棉铃虫基因组 DNA 的纯度已满足限制性内切酶消化的需要。因此，已制备的棉铃虫基因组 DNA 的完整性和纯度可以满足下一步构建基因组步移 DNA 文库的要求。

2.2　P450 基因 *CYP9A*12 5′-上游区序列的获得

通过第一次步移，获得长度为 2 942 bp 的 DNA 片段；通过第二次步移，又获得长度为 663 bp 的 DNA 片段；将所获两段序列进行拼接，共获得一长为 3 575 bp 的 DNA 片段。该 DNA 片段 3′端的序列与 *CYP9A*12 基因 cDNA 5′端序列一致，说明该片段确实是 *CYP9A*12 基因上游的启动子区。经与 GenBank 中 *CYP9A*12 的 cDNA 序列比对发现位于起始密码子上游 3 bp 处具有一段长为 2 124 bp 的内含子（图 3，4）。

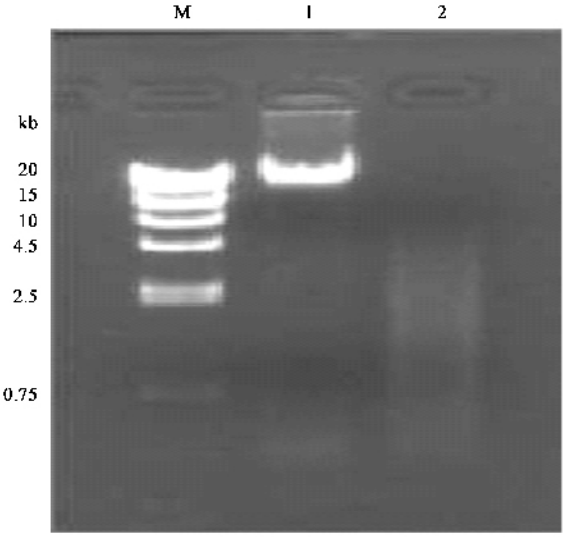

图 2　棉铃虫基因组 DNA 完整性和纯度的鉴定

Fig. 2　Identification of integrity and purity of genomic DNA of *Helicoverpa armigera*

M：DNA 分子量标记 DNA marker；1：基因组 DNA Genomic DNA；2：*Dra* Ⅰ 酶切的基因组 DNA Digested genomic DNA by *Dra* Ⅰ.

2.3　P450 基因 *CYP*9*A*12 5′-上游区序列的分析

利用 NNPP 在线分析软件分析 *CYP*9*A*12 基因起始密码子上游序列，预测出转录起始位点为位于起始密码子上游 2 259 bp 处的碱基 A，这与普遍发现的转录起始位点为 A 相一致，同时与用 5′-RACE 获得的 *CYP*9*A*12 全长 cDNA 的 5′-端序列是相同的。用 TFSEARCH 1.3 软件分析此序列，发现该序列具有启动子的基本转录元件：TATA-box 位于 − 30 bp，− 231 bp，− 283 bp，− 902 bp，− 1 254 bp 和 − 1 262 bp处；CAAT-box 位于 − 383 bp，− 627 bp，− 956 bp，− 1 084 bp 和 − 1 237 bp 处。进一步分析表明，该基因的 5′-上游区（包括内含子区域）存在 GATA-1，GATA-2，CdxA，C/EBP，Dfd，Oct-1 和 CRE/BP 等多种转录因子结合位点（图 3，4）。

```
AAAACTGTGCAACACTGGAAATGTCATTTTACTGACTCGAATTAAAAATCAGACTATAAATAATATATTTTTTGTTCTACCAATTTCACT  -1217
                                                          TATA-box           CAAT-box
CGAAAGGATCAAAATGGTTTGTGTGACTATACGTGAAGTATGATAGGCACGCACACAGCCGCGACGCTAGTCTGCGCGGTTTTTTGCGTT  -1127
                                       GATA-1
GAATTACCTAAAGTTGACATCGCGCGCCGAGCGTACACGCTCTTAAATAGAACAATAAAGTACAAAGGTATTCCTTACTTCTTAGGAAAT  -1037
   Dfd                                            CAAT-box                       C/EBPb
CTTTTCTAGCAAGCCCGCTATGGAAGACTTTAATCGGGATTAGTAGTATTGTTAAAAGCAAACATTTTTGGAACCTTTTAGCTTTTCAAT  -947
                                     Dfd                                          CAAT-box
AACTTAATTGGGTTCTTTAGTAAGTGGTACAAGAGAATCATCTGCTTACTACAATAATAAGTACACCTCTATCATCATCTGCCTAGCCTT  -857
                                                     TATA-box
TTCGTTTCTTTTTCTTTTTCCCCTTGTTTAAGTCAGCTTGCAGTTTAACTGCATGCAGCTGAGTACCAGTGTTTTACAAGGAACGACGGC  -767

ATATCTGAGCTCCTTAACCCAGTTACTCTGGCGACCTGATGCCTGGACCTTACTGGCTTCTGGCTACTTCTAACTTGACTAAGGAAGCTA  -677

AGGCCTAGTGCATTCCACCAGCACTTTGGGCCACCCGCAAGGTGGCGAACAGTCCACCTCAATAGCATTCCTAAGGGGGGTTAGCGTCAG  -587
                                                          CAAT-box
GCAGGTGGCCGGCTGTAAAACTTATGCCAAAAAAAATTGCGGAATGTTTAGGAAGGAGAAAACATGCAGCGCCGTCCCCAAATAAAATTG  -497
                                     C/EBP
GGATAAGGGCAGGAGAATGATGATGATGGAAAATCTCATCACGACAAGATGGACATATGTCCATGGACTGATCACGCCAAGCGTTGCTTT  -407
  GATA-1
ACATTTTGACTCGATCTAAACGTCTATGTTGTACAATATTCGCTAATTTCCACAAGGAGCATTTAAATATCGAAAAGGCCGAAAACTTTG  -317
                               CAAT-box
AAAAGACGTTCACTGCACGTTTCAGCTTTGATGTTGTTTAGCAATTATAATTACATTAAAAAACATATTTTTTGTATTTAATGTTTATAA  -237
                                           TATA-box
AATAAATATATGACATAAAAATTGCTTCTTTATTTTTACCGACTGCCGCAAAATCCGACTGCTAAATTGCGCATCGTAACGTGCTATCAT  -147
    TATA-box                    C/EBP
ATCAGATAAATACGTTCTATTTTAAATTGTAATTGGTAAACAAAAATAAGTGTTAAGCTTTTCAGCAGGGTATATACCTACTTAGCGATA  -57
  GATA-1                                                +1
ACGTGAGATATACAAACGTATCTACATATATATTAGCTTAGCTCGCTCTTAGTACAATCAGAAACGGCTTAACGGTGTTTCAAGTAACAC  +34
 GATA-2                  TATA-box                       推测的转录起始位点
GTCCGTGCGTACCAAACTTGTATTTGACGTTTAAATTACGCATTTTTAAATAAAAAATTGTGCCAGTTACACATACTAGTGTTGTGACAA  +124
                         CRE/BP
CATAAGTAAGC[GT----AG]ATGATACTAGTCCTGGTCTGGGTGGCG                                            +2287
```

图 3　棉铃虫细胞色素 P450 *CYP*9*A*12 基因 5′-上游区的序列

Fig. 3　The 5′-upstream region sequence of *Helicoverpa armigera* cytochrome P450 gene *CYP*9*A*12

[GT − − − − AG] 部分为内含子区域；加黑、下画线序列为转录因子结合位点；下图同。

[GT − − − − AG] indicates the intron area. Sequences in bold and underlined are transcription element binding sites. The same for the following figure.

3　讨论

对棉铃虫细胞色素 P450 *CYP*9*A*12 基因的上游调控序列分析表明，该序列不仅包含启动子的核心结构序列，亦包含一些特异的反应元件和转录因子结合位点。TATA 框具有将 RNA 聚合酶 Ⅱ 引导到正确转录起始位点的功能，从而使转录精确地开始，而 CAAT 框是调控转录速率的元件。而其他一些转录因子结合位点（包括 GATA-1，GATA-2，CdxA，C/EBP 和 Oct-1 等转录因子结合位点）则可能具有特异性调节基因转录的功能。有研究表明，多个 GATA 转录因子结合位点共同调控会显著增加报告基因的转录活性（Latinkic *et al*.，2004；Mura *et al*.，2004），但也有研究表明 GATA 会抑制基因的表达（Li *et al*.，1998；Nerlov *et al*.，2000）。依赖细胞类型及环境的变化，Oct-1 可增强或抑制基因的转录（Ogbourne and Antalis，1998）。CdxA 元件一般位于基因的 5′-端，作为启动子的一部分起作用，在表达 CdxA 蛋白的报告基因表达系统中，载体中含有的 CdxA 元件能够增强基因的转录活性（Margalit *et al*.，1993；Chang *et al*.，2004）。C/EBP、TATA-box 的点突变均可使 *leptin* 基因启动子的活性降低 10 倍（Mason *et al*.，1998）。Dfd 因子一般与发育调控有关（McGinnis and Krumlau，1992；Rorth，1994）。另外，本研究中还发现在 5 ′-调控序列的内含子中亦存在

GTAAGTATTTT**TTTTATA**TTTGGATTCAATATTGTTTTATTTCCGTAATTTTGTTTACGTTTTTTGTGACAGTTATTTTTATTGGTAGTCGTAGTTTTTC +233
CdxA

TATGGTACACAATTGTTTTGGTAGGTACTTTTTGTCTTCGATGAGTAAACTAATTGAATAGGTTAATCTTG**CTATTAATTAATTTAT**TTGACA**ATTTATA** +333
Dfd CdxA

GAGTAACGAATAAAAATAAATGAATAGCAAATTCGTGAATGAGACCGAT**TATTACGAAATA**TTAAGATTACTAGACCGCGAGTAATACTTGTTATATAAA +433
C/EBPa

A**ACTCGTAATTACGTA**AAATAAAGAAAGTTAAAACTGAAACCAGTTTTAAAATAGAGTTAAAGGCTTTTAGCACTAAATTTTAAATCAGCTGAGAATAAG +533
Oct-1

GAAT**AATTCTA**GATTGCTTTTAAATTCTATAATCGAAATACAAATTTCTCCGTTTGAATTTAATACCTATCCATAGTAACTCTTTAGAAACATGATTCTA +633
CdxA

ATCACAAAGTATTACAGTGGACTGTAAGACGATTGTAATAGGGCGATATAGGTAGGTA**ATAGAGGATTAACTACA**GATACATAGTTACAGTAC**CTACTGT** +733
Dfd HFH-1

TTAGTTTATAATTACAGTCACACATAGGTATTCTCGACACATAGACTCGA**TTGATAATAATTGT**TACCTATTTACGCTTCTAAAAGCATTTGCGTGCATT +833
Oct-1

AAATATTGTAAACATCAAATACTAAAAAACTTTAAATAACCACCTCTAAACAATGTTAATGTACTAA**TACATGGAAAATGGAG**GGGTT**TATGAGATAAGA** +933
Brn-2 GATA-1

GCATATCATTGGTATTAAATCGAGTGAAAAAAAAACATCGGGATTTTAATTTGTCAAGATCTGAATTGAAACAG**ACATTGACAAAACT**TCTCTTTAAATA +1033
C/EBPa

T**AATAATA**TAACTTACCGATGGACTTATTATGTGACTAAGTACATGAGCACCTAAATACTGAATGAGTCGTATGAATAAACGGTGAATCGTCTAACACGC +1133
CdxA

CCAGCACTACTGCAAAATTACTTGGTAAACAATAATATTATGATTTGAAATCGTGTTTTATATGTGTCAAACCGGTTTTATTACGTTTTGGTTATCAGGT +1233

TTTAATGACATTTAAAAACAGTGTATTAAAGTTTTAACATAGTCGAGTCATCACTTTTGATATGTTTTTGAATTCTGAGTTTAACAATTA**AATCCTATTA** +1333
Dfd

CTACATGCATGAGGAAAATTTATTTTAAAATGTTAACTTTGAAGTTTGTTTTAAGATGAAAGTATAAAATACTTTTAAATCTTTAAGTCTTCTAATTAAG +1433

TACTAACCTCCCCACTCAGAGACATTAATGG**TTACTTA**AGCCATTCCTCAGTGAAGGATTGTATGACATTCCGTCACTAAGAAGTGACTTAAGTAATCAT +1533
CdxA

TAAATGTCTCTGCGTGGGGAGGTAAACGTTATTGTAATTTTTTCTTTGCTGGAATAAGAAGATCGATATCAAATGTGAAAATCGATACTGAAAATCCACA +1633

TTCCACAATTAATTAAAGAAGATTAATGGATTGTCAT**TAACAATGCAAATTAAGTAT**AATCTTTATACAAATCCTGTCGAGTGGTTTACCTTGGTACTAA +1733
Oct-1

CACATGAAGCGTATACTTATTTACTAATACTTAGAAAACACGTGGTACAAAATGTGTACACATAGGTACAATATGTTAATTATGTACTTAAACGTAA**TCA** +1833

AGATAATTATGATTGTTTGTCTGTGACTTTATCTAGTCTTA**CATGAAGTT**AATACTAAAGTGCATGTTTTGAAGATAGTGACTGATAAAAAAATGATAAA +1933
GATA-1 CRE/BPa

AAATCATTTAGGCTTTAAGGAAGCCACATTCAATTATGTTATCTATAAGGATGATCCAAATAATTTAAATATAGATAAAACCGTTTTGTTGCTTGTAGAA +2033

TCAACTCGAAGATATAGATATTCTAAAGGTATTTAATGAAGGTTATAATATAACAAGAAGTGTCATGAAAGTGCATAAAATGATCCTA**AATATTGATAAA** +2133
C/EBPa

AATGAAAACGATGAATAGTAATAAAAAGGTATAAGTGTAACTTTGAAATAAAATACAATTGAAGATCTCAATGAAGACAA**AATATTA**GCAGCAATAATAA +2233
CdxA

CGCTAAACACAATCGTTGTTAC**AG** +2257

图 4 棉铃虫细胞色素 P450 *CYP9A12* 基因 5′-非翻译区中内含子的序列

Fig. 4 Sequences of the intron within the 5′-UTR region of *Helicoverpa armigera* cytochrome P450 gene *CYP9A12*

着许多转录因子结合位点,推测其上的调控位点可能同样具有特异性调节基因转录的功能。许多真核生物基因启动子内部存在内含子,改变这些内含子可能影响基因表达的效率以及 mRNA 的稳定性(Garbarino *et al*., 1995)。多种植物 *Polyubiquitin* 基因启动子中的内含子被证明与基因的表达相关(Binet *et al*., 1991;Genschik *et al*., 1994;Garbarino *et al*., 1995;Plesse *et al*., 1997)。

与其他真核生物的基因一样,细胞色素 P450 基因的转录调控一般通过顺式作用元件与反式作用因子复杂的相互作用来实现。每个 P450 基因上都有许多特定的顺式作用元件,并主要分布于基因的 5′-上游调控区,基因的各种顺式作用元件则构成多种不同组合模式,使与之相对应的各反式作用因子相互作用,共同完成对 P450 基因转录的有效控制。启动子的克隆是对基因表达调控进行研究的必要条件。基因组步移技术是克隆基因启动子区域最常用亦是最有效的方法,它是一种新发展的利用 PCR 技术来分离与已知序列毗邻的未知 DNA 序列的方法,较传统的基因组 DNA 文库筛选法要简便、快捷。通过多步骤的基因组步移,不仅可以填补基因组图谱之间的空隙,对获得由传统文库筛选法丢失的克隆也非常有用。本实验运用基因组步移方法成功地从棉铃虫中克隆出细胞色素 P450 基因 *CYP9A12* 上游调控序列,并利用软件预测出多种顺式作用元件,为今后的功能验证研究奠定了一定基础。

参 考 文 献 (References)

Binet MN, Lepetit M, Weil JH, 1991. Analysis of a sunflower polyubiquitin promoter by transient expression. *Plant Sci*., 79:87–94.

Chang MH, Chou CM, Hsieh YC, Lu IC, Devi MK, Chang JP, Kuo TF, Huang CJ, 2004. Identification of 5′-upstream region of pufferfish ribosomal protein L29 gene as a strong constitutive promoter to drive GFP expression in zebrafish. *Biochem*. *Biophys*. *Res*. *Commun*., 314:249–258.

Chen S, Yang YH, Wu YD, 2005. Correlation between fenvalerate resistance and cytochrome P450 mediated O-demethylation activity in

Helicoverpa armigera（Lepidoptera：Noctuidae）. *J. Econ. Entomol.*，98：943－946.

Chung H，Bogwitz MR，McCart C，Andrianopoulos A，Ffrench-Constant RH，Batterham P，Daborn PJ，2007. *Cis*-regulatory elements in the accord retrotransposon result in tissue-specific expression of the *Drosophila melanogaster* insecticide resistance gene *Cyp6g1*. *Genetics*，175：1 071－1 077.

Feyereisen R，1999. Insect P450 enzymes. *Annu. Rev. Entomol.*，44：507－533.

Feyereisen R，2005. Insect cytochrome P450. In：Gilbert L，Iatrou K，Gill S eds. Comprehensive Molecular Insect Science. Oxford：Elsevier Pergamon. 4：1－77.

Genschik P，Marbach J，Uze M，1994. Structure and promoter activity of a stree and developmentally regulated polyubiquitin-encoding gene of *Nicotiana tabacum*. *Gene*，148：195－202.

Garbarino JE，Oosumi T，Belknap WR，1995. Isolation of a polyubiquitin promoter and its expression in transgenic potato plants. *Plant Physiol.*，109：1 371－1 378.

Latinkic BV，Cooper B，Smith S，Kotecha S，Towers N，Sparrow D，Mohun TJ，2004. Transcriptional regulation of the cardiac-specific MLC2 gene during *Xenopus* embryonic development. *Development*，131：669－679.

Li J，Noguchi CT，Miller W，Hardison R，Schechter AN，1998. Multiple regulatory elements in the 5′-flanking sequence of the human epsilon-globin gene. *J. Biol. Chem.*，273：10 202－10 209.

Margalit Y，Yarus S，Shapira E，Gruenbaum Y，Fainsod A，1993. Isolation and characterization of target sequences of the chicken CdxA homebox gene. *Nucleic Acids Res.*，21：4 915－4 922.

Mason MM，He Y，Chen H，Quon MJ，Reitman M，1998. Regulation of leptin promoter function by SP1，C/EBP，and a novel factor. *Endocrinology*，139：1 013－1 022.

McGinnis W，Krumlan R，1992. Homeobox genes and axial patterning. *Cell*，68：283－302.

Mura C，Le Gac G，Jacolot S，Ferec C，2004. Transcription regulation of the human *HFE* gene indicates high liver expression and erythropoiesis coregulation. *FASEB J.*，18：1 922－1 924.

Nerlov C，Querfurth E，Kulessa H，Graf T，2000. GATA-1 interacts with the myeloid PU.1 transcription factor and represses PU.1-dependent transcription. *Blood*，95：2 543－2 551.

Ogbourne S，Antalis TM，1998. Transcription regulation of the human Sp1 gene promoter by the specificity protein（Sp）family members nuclear factor Y（NF-Y）and E2F. *Biochem. J.*，371：265－275.

Plesse B，Durr A，Marbach J，Genschik P，Flech J，1997. Identification of a *cis*-regulatory element in *Nicotiana tabacum*，polyubiquitin gene promoter. *Mol. Gen. Genet.*，254：258－266.

Rorth P，1994. Specification of C/EBP function during *Drosophila* development by the bZIP basic region. *Science*，266：1 878－1 881.

Scott JG，1999. Cytochromes P450 and insecticides resistance. *Insect Biochem. Mol. Biol.*，29：757－777.

Shen JL，Wu YD，1995. Insecticide Resistance and Resistant Management in *Helicoverpa armigera*. China Agriculture Press，Beijing.［**沈晋良，吴益东**，1995. **棉铃虫抗药性及其治理**. **北京：中国农业出版社**］

Sibert PD，Chenchik A，Kellogg DE，Lukyanov KA，1995. An improved method for walking in uncloned genomic DNA. *Nucleic. Acids Res.*，23：1 087－1 088.

Wu YD，Shen JL，Tan FJ，You ZP，1995. Mechanism of fenvalerate resistance in *Helicoverpa armigera*（Hübner）. *J. Nanjing Agri. Univ.*，18：63－68.［**吴益东，沈晋良，谭福杰，尤子平**，1995. **棉铃虫对氰戊菊酯抗性机理研究**. **南京农业大学学报**，18：63－68］

Yang EH，Yang YH，Wu SW，Wu YD，2005. Relative contribution of detoxifying enzymes to pyrethroid resistance in a resistant strain of *Helicoverpa armigera*. *J. Appl. Entomol.*，129：521－525.

Yang YH，Wu YD，Chen S，Devine GJ，Denholm I，Jewess P，Moores GD，2004. The involvement of microsomal oxidases in pyrethroid resistance in *Helicoverpa armigera* from Asia. *Insect Biochem. Mol. Biol.*，34：763－773.

Yang YH，2005. Biochemical and Molecular Mechanisms of Oxidative Metabolism for Pyrethroid Resistance in *Helicoverpa armigera*（Hübner）. PhD Thesis，Nanjing Agricultural University，Nanjing. 53－71.［**杨亦桦**，2005. **棉铃虫对拟除虫菊酯氧化代谢抗性的生化与分子机理**. **南京：南京农业大学博士学位论文**. 53－71］

Yang YH，Chen S，Wu SW，Yue LN，Wu YD，2006. Constitutive overexpression of multiple cytochrome P450 genes associated with pyrethroid resistance in *Helicoverpa armigera*. *J. Econ. Entomol.*，99：1 784－1 789.

（责任编辑 黄玲巧）